

論文審査の結果の要旨

氏名 平野 有沙

本論文は全四章で構成されており、第一章は全体の研究背景である。ほ乳類の概日時計の背景知識として、(1) 概日時計の発振を担う転写・翻訳を介したネガティブフィードバックモデル、(2) 時計タンパク質の中核因子 **CRY** タンパク質について概説している。当該分野においては『**CRY** タンパク質がどのように合成され、どのように減少するか』という **CRY** のタンパク質ダイナミクスを生み出す分子機構の解明が重要な研究課題である。

第二章は、**CRY2** のリン酸化部位の変異マウスを用いた研究結果がまとめられており、研究の背景、実験手法、実験結果、考察の四項目から成る。背景では、概日時計における時計タンパク質のリン酸化シグナルの重要性が例示されている。マウス **CRY2** は C 末端の 2 つの近接したセリン残基が段階的にリン酸化され、分解制御を受ける。しかし、この分解機構の概日時計における生理的意義は未解明であった。そこで論文提出者は、**CRY2** の一次リン酸化部位 **Ser557** に変異を導入したマウスを作製し、**CRY2** 分解が果たす役割の解明を目指した。マウスの輪回し行動解析により、変異マウスでは野生型マウスに比べて長周期の行動リズムを示すことを明らかにした。肝臓における時計因子の発現リズムを解析したところ、変異マウスにおいては **CRY2** と **PER2** タンパク質が核で過剰に蓄積していた。一方、**CRY2**-**PER2** 複合体のターゲット遺伝子の mRNA の発現量が減少していた。これらの結果から、**CRY2** のリン酸化に依存した分解制御は **CRY2** の過剰な蓄積を抑制し、時計遺伝子の発現と概日時計の周期を調節すると結論した。考察では、本研究で得られた実験結果とキナーゼの機能阻害の実験結果と比べて議論し、タンパク質の修飾部位の変異マウスを作製することの有用性と、実験結果の正確性が述べられている。

第三章は、**FBXL21** による **CRY1** と **CRY2** 安定性の制御機構とその生理的役割についての研究成果がまとめられている。**CRY** は **F-box** タンパク質 **FBXL3** による分解制御を受け、*Fbxl3* の点変異マウスは長周期の行動リズムを示す。しかし、**FBXL3** と最も近縁な **F-box** タンパク質である **FBXL21** の概日時計における役割はまったく不明であった。論文提出者は、*Fbxl3* と *Fbxl21* 欠損マウスを使用し、行動リズム制御における *Fbxl21* の役割を調べた。その結果、*Fbxl3*

欠損マウスの異常な長周期性が *Fbxl21* の欠損により大きく緩和された。さらに、*Fbxl3/Fbxl21* 二重欠損マウスの一部は、恒暗条件において行動リズムが消失した。興味深いことに、FBXL21 は CRY をユビキチン化して CRY の安定化に寄与することが明らかとなった。これらの結果を受け、考察では FBXL3 による CRY の分解と FBXL21 による CRY の安定化機構は、CRY タンパク質量のダイナミクスを生み出し、概日時計の安定な振動の維持に必須であると結論した。

第四章は総括が述べられている。本研究により、時計の中核因子 CRY がいかに複雑な翻訳後修飾ネットワークに制御されているかが明らかになった。近年、CRY はグルココルチコイド受容体や G タンパク質と相互作用して代謝に関わるシグナルを負に制御することが報告された。ユビキチン化修飾による CRY タンパク質量の厳密な制御は、概日時計の発振だけではなく、代謝制御にも極めて重要であることを示す。論文提出者は、ユビキチン化による CRY の制御ネットワークを CRY のユビキチンコードと称している。今後は脱ユビキチン化酵素によるユビキチン修飾のスイッチングを含めた、CRY ユビキチンコードの解明が課題であると結論づけている。

なお、本論文の第二章で得られた研究成果は、倉林 伸博、塩井 剛、深田 吉孝との共同研究による。また、本論文の第三章は、弓本 佳苗、恒松 良佑、松本 雅記、尾山 大明、秦 裕子、中川 智貴、ダーリン ランジャコーンシリパン、中山 敬一、深田 吉孝との共同研究によるが、いずれも論文提出者が主体となって研究計画を考案し、分析および検証を行ったもので論文提出者の寄与が十分と判断する。

審査時点での本論文は、略語や専門用語に関する説明が乏しかった。さらに、CRY2 のリン酸化部位の変異が、CRY2 のタンパク質の安定性だけでなく、転写抑制活性や、他の時計タンパク質との相互作用に影響を与えるか否かの記述がなく、本論文の結論に至るには適切ではないと判断したため、本文の変更を要求した。変更後の論文では、それらについて正確な記述とデータが追加されており、審査委員は全員一致で合格と判断した。したがって審査委員会は、論文提出者に博士（理学）の学位を授与できると認める。